

坚龙胆的快速繁殖

朱宏涛 陈可可 张颖君 杨崇仁*

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘要 对野生坚龙胆的腋芽进行诱导、筛选和培养,得到芽与根的优化培养基和培养条件,建立了无性繁殖培养系,获得完整植株,并移栽成功。

关键词 坚龙胆;快速繁殖

MICRO PROPAGATION OF *GENTIANA RIGESCENS*

ZHU Hong-tao, CHEN Ke-ke, ZHANG Ying-jun, YANG Chong-ren*

(*Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China*)

Abstract The complete individual plants of *Gentiana rigescens* were induced from the axillary bud by a tissue culture technology. The induced plants were planted outside and grows healthily.

Key words *Gentiana rigescens*; rapid propagation

坚龙胆(*Gentiana rigescens* Franch.)为龙胆科龙胆属植物,主要分布于四川、云南和贵州等地的向阳坡地、荒草地,其模式标本采于云南大理^[1]。坚龙胆以其根茎入药,是中国药典收录的传统中药材龙胆的主要品种之一,为常用大宗中药材,远销国内各地区,具有清肝胆实火,除下焦湿热、健脾、降压和保肝利胆等多种功效^[2]。坚龙胆根茎极短,根系不发达,野生药材难于满足市场需求。对中药材龙胆愈伤组织诱导培养及细胞克隆系的建立与培养方面已有报道^[2],但离推广应用仍有相当的距离,且多为东北产的同属植物。对同属植物的栽培亦多以种子为繁殖材料^[3-5],不仅种源供应不足,而且长期应用实生繁殖容易造成种源退化,质量下降。为解决坚龙胆从野生变家种过程中的种源问题,保证优良的种质资源和可持续利用,本文报道利用不同激素和激素浓度组成的培养基通过组织培养手段和育苗技术在短时间内培养大量健壮的坚龙胆成苗的方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

昆明市北郊大马山采集的野生坚龙胆(*Gentiana rigescens* Franch.)植株,取其肥壮腋芽作为原始繁殖材料。

1.2 外植体消毒和接种

将采回的植株用碱性肥皂水洗去表面污泥后用清水洗净,再用蒸馏水冲洗1~2次。取其顶芽和腋芽在75%的乙醇溶液中浸泡2 min后取出,用无菌水冲洗3~4次,以无菌滤纸吸干,再置于0.1%的升汞(HgCl₂)溶液中浸泡40 min,用无菌水冲洗5~6次,以无菌滤纸将水吸干。用解剖刀和镊子在无菌超净工作台中拨去灭菌时损伤的腋芽和顶芽鳞片,将保留部分自中间部位剖开,分别接种于事先准备好的培养基中(为防止交叉感染一瓶培养基接种一块外植体)。

1.3 外植体的培养及诱导

以1/2 MS和MS培养基为基本培养基,添加不同浓度和组合的激素(6-苄基氨基嘌呤(6-BA)、吲哚乙酸(IAA)、激动素(KT)、奈乙酸(NAA)、水解酪蛋白,及活性炭等)于培养基中。将消毒处理好的外植体接种于培养基上,于温度19~20℃,相对湿度60%的黑暗中诱导培养。19 d后将诱导出的幼苗移植于温度21~23℃,光照3000LX,每日光照8 h

收稿日期:2003-12-08

接受日期:2004-02-13

* 通讯作者 Tel:86-871-5223235;E-mail:zhangyj@mail.kib.ac.cn

的条件下培养。诱导培养出的健康植株经练苗后移栽到实验地中。

2 结果与讨论

2.1 不同植物激素组合及浓度对比对坚龙胆外植体芽诱导的影响

将处理过的野生坚龙胆外植体接种于添加有不同激素(6-BA, NAA 和 KT)浓度和组合的 MS 培养基上, 进行外植体芽的诱导培养(表 1)。结果发现 6-BA 的添加对于坚龙胆诱导外植体芽的形成起着关键的作用。而且, 不同浓度的 6-BA 对坚龙胆外植体芽的分化能力有着显著的差异。实验表明, 浓度为 1 mg/L 左右的 6-BA 能促进芽的分化。NAA 和 KT 对植物营养的平衡有着调节机能, 在添加有适宜浓度的 NAA 和 KT 组合的培养基中, 外植体芽

表 1 植物激素对坚龙胆外植体芽诱导的影响

Table 1 Effects of plant hormones to induce the bud formation from the explant of *G. rigescens*

激素组合(mg/L) Hormone combination			接种数量 Inoculated amount (piece)	诱导成功 量(块)Bud information (piece)	诱率(%) Induced rate(%)
6-BA	NAA	KT			
0.4	0	0	100	5	5
0.4	0.1	0	100	4	4
0.4	0.2	0.1	100	7	7
0.4	0.4	0.2	100	4	4
0.4	0.6	0.3	100	4	4
0.8	0	0	100	20	20
0.8	0.1	0	100	19	19
0.8	0.2	0.1	100	19	19
0.8	0.4	0.2	100	15	15
0.8	0.6	0.3	100	17	17
1.0	0	0	100	63	63
1.0	0.1	0	100	73	73
1.0	0.2	0.1	100	90	90
1.0	0.4	0.2	100	65	65
1.0	0.6	0.3	100	61	61
1.4	0	0	100	52	52
1.4	0.1	0	100	55	55
1.4	0.2	0.1	100	59	59
1.4	0.4	0.2	100	53	53
1.4	0.6	0.3	100	53	53
1.6	0	0	100	49	49
1.6	0.1	0	100	55	55
1.6	0.2	0.1	100	54	54
1.6	0.4	0.2	100	41	41
1.6	0.6	0.3	100	40	40

分化的数量明显增加。诱导坚龙胆外植体芽分化的

最佳植物激素组合为 6-BA, NAA, KT, 三者的浓度分别为 1.0 mg/L, 0.2 mg/L 和 0.1 mg/L。

2.2 不同植物激素组合对坚龙胆快繁苗生长情况的影响

幼苗的生长比分化诱导需要更多的营养物质。在幼芽诱导培养基中分化成苗, 需及时转接到繁殖培养基中, 否则幼苗极易黄化、枯萎或生长细弱。而转入适宜的培养基后, 幼苗可以生长健壮。将分化后的苗转入添加有不同激素(6-BA, IAA, KT 和水解酪蛋白)浓度和组合的 MS 培养基上, 进行快繁培养。结果表明, 激素的添加对幼苗高生长和粗生长无明显影响, 但对繁殖系数具有决定性的作用。最高繁殖系数的各激素浓度组分别为 6-BA: 1.0 mg/L, IAA: 0.2 mg/L, KT: 0.4 mg/L 和水解酪蛋白: 200 mg/L(表 2)。

表 2 植物激素对坚龙胆快繁苗生长情况的影响

Table 2 Effects of plant hormones for the growth situation of *G. rigescens*

激素组合及后含物的添加情况 mg/L Hormones combination & subordination				繁殖系数 Propagation modulus	高度 (厘米) Tallness (cm)	粗度 φ (毫米) Dia (mm)
6-BA	IAA	KT	水解酪蛋白			
1.0	0	0	200	2.3	5.21	0.95
1.0	0.1	0.2	200	2.7	5.04	0.89
1.0	0.2	0.4	200	7	5.37	1.0
1.0	0.4	0.6	200	5	4.98	1.01
1.4	0.1	0.2	200	5.2	5.32	0.98
1.4	0.2	0.4	200	6.1	5.00	0.88
1.4	0.4	0.6	200	5.9	4.78	0.97

注: 此数据为接种 26 d 后统计结果

6-BA: 6-Benzyl amino purine; IAA: 3-Indolylacetic acid;

KT: 6-Furfuryl amino purine; 水解酪蛋白: Casein hydrolysate

2.3 植物激素组合对坚龙胆快繁苗正常根诱导及苗质量的影响

在加有不同激素组合的 1/2 MS 培养基中加入 200 mg/L 活性炭, 进行快繁苗正常根诱导的培养, 21 d 后将诱导成的完全苗移栽, 14 d 后统计幼苗的成活率(表 3)。结果发现, 各激素组合中无根苗根分化的初始时间和分化率均无明显的差异。但从移栽成活率中可以看出在加有 6-BA 和 KT 组合的培养基中分化出来的正常根具有较高的成活率。究其原因, 在于少量的细胞分裂素有利于调节生长素运转的速度和向根部运输的数量, 减少根诱导过程中的伤中愈伤化, 使根直接产生于不定根的活动部位, 在根与植株间无疏松、易断的愈伤组织层存在, 有利于水分、营养的运输, 提高移栽的成活率。

表3 不同激素组合对坚龙胆正常根诱导的影响

Table 3 Effects of different plant hormones combination on the formation of *G. rigescens*

激素组合 Hormone combination	幼根初始分化时间(天) The time of showing tender root(d)	分化率 Differentiation rate(%)	移栽成活率 Living rate after transplanting (%)
—	61	54	73
IAA	19	80	82
IAA 6-BA	19	87	87
IAA 6-BA KT	14	90	98
NAA	21	71	79
NAA 6-BA	21	80	89
NAA 6-BA KT	15	85	92

本项工作通过改变不同激素的组合和浓度,对野生坚龙胆腋芽进行诱导和培养,得到了诱导该植物芽与根的最佳培养基和培养条件,建立了无性繁殖培养系,并获得完整植株的成功移栽。

参考文献

- 1 罗集鹏,楼之岑.中药龙胆原植物的调查与鉴定.药学学报,1987,22(7):525-532
- 2 周云罗,钱迎倩,蔡起贵,等.龙胆叶肉原生质体再生愈伤组织的研究.植物学报,1985,27(2):148-150
- 3 张铭远,王素珍,陈克力,等.龙胆草野生变家植栽培技术.特产研究,1991,13(2):63-64
- 4 赵敏.关龙胆栽培技术.植物杂志,1990,17(3):12-13
- 5 赵敏.龙胆草栽培技术.生物学杂志,1990,7(6):23-24

RESEARCH HOT FRONTS FOR NATURAL PRODUCT

Ancistrotanzanine C and Related 5,1'-and 7,3'-Coupled Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis* 1

Gerhard Bringmann, Michael Dreyer, Johan H. Faber, Petur Weihe Dalsgaard, Dan Stærk,

Jerzy W. Jaroszewski, Henry Ndangalasi, Frank Mbago, Reto Brun, Søren Brøgger Christensen

Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany, Department of Medicinal Chemistry, Danish University of Pharmaceutical Sciences, Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen, Denmark, Department of Botany, University of Dar es Salaam, P. O. Box 35060, Dar es Salaam, Tanzania, and Swiss Tropical Institute, Socinstrasse 57, CH-4002 Basel, Switzerland

Received November 24, 2003

Three new naphthylisoquinoline alkaloids, the 7,3'-coupled ancistrotanzanine C (6), the 5,1'-coupled *O*-methylancistrocladinine (7), and the likewise 5,1'-coupled *O*,*N*-dimethylancistrocladine (8, previously known only as a partial-synthetic compound), have been isolated from the highland liana *Ancistrocladus tanzaniensis*, along with the two known 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids ancistrocladine (4) and ancistroretorine (5). All of the compounds are *S*-configured at C-3 and bear an oxygen at C-6, and thus belong to the so-called Ancistrocladaceae type, similar to 1-3 previously isolated from this newly discovered plant species. The structural elucidation was achieved by chemical, spectroscopic, and chiroptical methods. The biological activities of the alkaloids against the pathogens causing malaria tropica, leishmaniasis, Chagas' disease, and African sleeping sickness were evaluated.

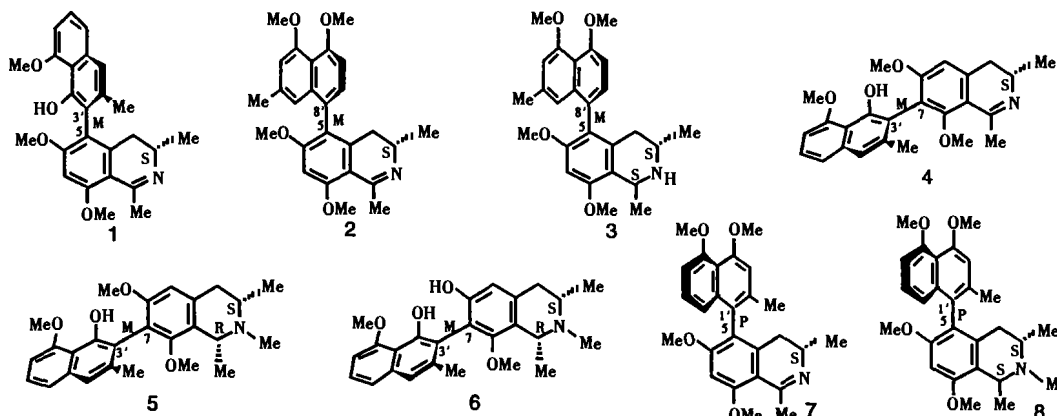


Fig. 1 Structures of naphthylisoquinoline alkaloids 1-8 isolated from *Ancistrocladus tanzaniensis*